



Office de la Propriété
Intellectuelle
du Canada

Un organisme
d'Industrie Canada

Canadian
Intellectual Property
Office

An agency of
Industry Canada

CA 2309327 A1 2001/12/06

(21) **2 309 327**

(12) **DEMANDE DE BREVET CANADIEN
CANADIAN PATENT APPLICATION**

(13) **A1**

(22) Date de dépôt/Filing Date: 2000/06/06

(41) Mise à la disp. pub./Open to Public Insp.: 2001/12/06

(51) Cl.Int.⁷/Int.Cl.⁷ C12Q 1/02, A61K 39/00, C12Q 1/48,
C12Q 1/18

(71) Demandeur/Applicant:
UNIVERSITÉ LAVAL, CA

(72) Inventeurs/Inventors:
GIASSON, LUC, CA;
PARROT, MARC, CA;
MAGÉE, BEATRICE B., US

(74) Agent: SWABEY OGILVY RENAULT

(54) Titre : CIBLE CELLULAIRE D'AGENTS THERAPEUTIQUES CONTRE CANDIDA ALBICANS

(54) Title: CELL TARGET OF THERAPEUTIC AGENTS AGAINST CANDIDA ALBICANS

1. Titre de l'invention

Identification d'une cible cellulaire pour le développement d'agents thérapeutiques contre le pathogène fongique *Candida albicans*.

2. Domaines d'application de l'invention

Biomédical.

3. Applications commerciales de l'invention

Développement d'agents thérapeutiques antifongiques dirigés contre le pathogène humain *Candida albicans*.

4. Résumé de l'invention

Nous avons identifié, cloné et séquencé le gène codant pour la sous-unité régulatrice d'une protéine kinase AMP cyclique dépendante (*cAMP-dependent protein kinase*: PKA) chez le pathogène humain *Candida albicans*. Les résultats d'expériences visant à déléter ce gène ont démontré que sa présence était essentielle à la croissance du pathogène. Cette caractéristique en fait une cible cellulaire pour le développement d'agents thérapeutiques anti-*Candida*. De telles cibles sont extrêmement rares.

DÉCOUVERTE: la protéine PKA-R est essentielle à la survie de *Candida albicans*.
INTÉRÊT: la protéine PKA-R constitue une cible cellulaire pour le développement de substances anti-*Candida*.

Étant donné l'intérêt des compagnies pharmaceutiques et biotechnologiques pour de telles cibles, il est certain que si nos résultats ne sont pas protégés, ils seront récupérés par ces dernières. Toutes les retombées potentielles, en terme de recherche et de développement, seraient alors perdues.

5. Description de l'invention

5.1. Le pathogène

L'incidence des infections fongiques a augmenté de façon dramatique au cours des deux dernières décennies. L'augmentation a été telle que les mycoses systémiques représentent maintenant une importante cause de morbidité et de mortalité. Parmi toutes les mycoses, les candidiases, causées par *Candida albicans* sont de loin les plus importantes (Groll *et al.*, 1998; Pfaller 1992).

C. albicans est un mycète opportuniste normalement présent dans les muqueuses buccale, intestinale et vaginale. Celui-ci devient cependant pathogène lorsqu'un déséquilibre survient dans le système de défense de l'hôte ou que la flore microbienne indigène est perturbée (traitements aux antibiotiques). Ainsi, les candidiases accompagnent souvent l'immunosuppression (e.g. lors de greffes, de thérapies cytotoxiques, de radiothérapie ou d'usage de corticostéroïdes), l'immunoincompétence et l'immunodéficience. Chez les patients sévèrement immunocompromis, *C. albicans* peut causer des infections systémiques graves menant fréquemment au décès (Groll *et al.*, 1996; Walsh *et al.*, 1996; Minamoto & Rosenberg, 1997).

5.2. Le contexte de recherche

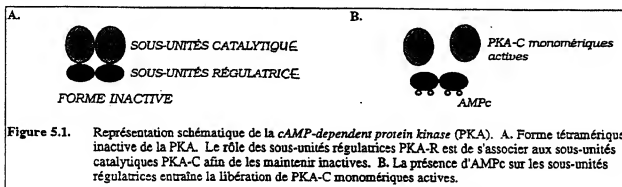
Le nombre limité de médicaments antifongiques efficaces et sans effet secondaire important, de même que l'augmentation de la prévalence des infections fongiques mettent en évidence l'urgence de développer de nouveaux agents antifongiques (Sternberg 1994).

Au cours des dernières années, une approche basée sur l'identification et la dissection de réactions enzymatiques et de sentiers métaboliques essentiels au fonctionnement de la cellule, a été exploitée pour l'identification de cibles avec lesquelles il serait possible d'interférer. En sélectionnant de telles cibles, ~~il est ensuite possible d'identifier des substances antagonistes de~~ leur fonction pouvant par la suite être utilisées pour la production d'agents thérapeutiques.

5.3. L'approche de recherche

Comme plusieurs autres mycètes d'importance médicale, *C. albicans* peut de manière réversible alterner entre une croissance levuriforme (cellules ovoïdes) et une croissance mycélienne (cellules hyphoïdes), ce qu'est le dimorphisme. Comme chez *C. albicans* la forme mycélienne est impliquée dans la virulence, et comme le dimorphisme est particulier aux champignons, celui-ci représente une source potentielle de cibles pour le développement de substances antifongiques. En utilisant une approche moléculaire, nous avons entrepris de démontrer l'implication d'une enzyme, appelée *cAMP-dépendent protein kinase* (PKA), dans le contrôle de la transition levure-mycélium. Plusieurs données suggèrent que cette enzyme pouvait être impliquée dans le contrôle du dimorphisme.

La PKA est une protéine tétramérique composée de deux sous-unités catalytiques (PKA-C) et de deux sous-unités régulatrices (PKA-R). Sous sa forme tétramérique, la PKA est inactive. Cependant, en présence d'adénosine monophosphate cyclique (AMP cyclique), les sous-unités régulatrices se dissocient des sous-unités catalytiques qui deviennent alors actives (Figure 5.1).



Afin de déterminer l'implication de PKA-C et PKA-R dans le contrôle de la transition levure-mycélium, nous avons cloné les gènes les encodant. Pour ce faire nous avons fait une analyse des séquences de gènes homologues chez d'autres organismes fongiques afin d'identifier des régions conservées. À partir de deux courtes régions relativement bien conservées, nous avons synthétisé des amorces dégénérées afin d'amplifier une portion des gènes par la technique de *Polymerase chain reaction* (PCR). La portion amplifiée de chacun des deux gènes a ensuite été utilisée comme sonde afin d'isoler des clones à partir d'une banque génomique fosmidique de *C. albicans*.¹ Par la suite, des sous-clones ont été utilisés afin de déterminer la séquence des gènes *Pka-r* et *Pka-c* encodant les sous-unités régulatrices et catalytiques respectivement.

Selon notre hypothèse de travail, l'activation de la PKA (en présence d'AMP cyclique) permet de déclencher la transition levure-mycélium. Afin de vérifier l'implication des gènes codant pour les sous-unités catalytiques et régulatrices dans le contrôle du dimorphisme, nous avons entrepris de déléter chacun de ceux-ci chez *C. albicans*. Ainsi, la délétion du gène *Pka-c* (aucune PKA-C active dans la cellule) devait empêcher la souche d'opérer la transition levure-mycélium en présence d'AMP cyclique, alors que la délétion du gène *Pka-r* (PKA-C toujours active dans la cellule, puisque la PKA-R n'est pas présente pour l'inactiver) devait permettre une croissance mycélienne constitutive, c'est-à-dire même en absence d'AMP cyclique.

¹ Une banque fosmidique est construite dans un vecteur contenant l'origine de répllication du plasmide F' de *E. coli*.

Ce vecteur, présent en une seule copie par cellule, diminue les possibilités de réarrangement à l'intérieur des clones.

Les mutants *pka-c* obtenus ne pouvaient effectivement opérer la transition levure-mycélium en présence d'AMP cyclique. Ces résultats supportaient donc notre hypothèse selon laquelle la PKA est impliquée dans le contrôle de la transition levure-mycélium. Afin de confirmer notre hypothèse, nous avons alors entrepris de générer des mutants pour le gène *Pka-r*.

5.4. La mutagenèse de *Pka-r*

Afin de faciliter la compréhension des résultats obtenus lors des expériences de mutagenèse de *Pka-r*, des explications sont données sur le fonctionnement de la méthode utilisée.

C. albicans est un organisme diploïde, c'est-à-dire qu'il possède deux copies de chacun des chromosomes (donc deux allèles pour chacun des gènes). Pour générer un mutant, il faut donc inactiver les deux allèles du gène à l'étude. Ainsi, pour réaliser les expériences de mutagenèse (pour les gènes *Pka-c* et *Pka-r*), nous avons utilisé la *URA blaster technique* permettant de déléter les deux allèles d'un gène chez *C. albicans*. Cette méthode, mise au point il y a quelques années, permet de déléter séquentiellement les deux allèles avec une efficacité variant entre 20 et 100%.² Ainsi, l'analyse d'une dizaine de transformants permet généralement d'identifier les mutants recherchés.

Une construction (appelée pMP1) fut d'abord générée, dans laquelle une cassette - contenant le gène *Ura3* situé entre deux séquences répétées *cat* - fut flanquée de séquences situées de part et d'autre du gène *Pka-r* (Figure 5.2). Dans cette construction, le gène *Ura3* (impliqué dans la synthèse de l'uracil) est utilisé comme marqueur pour la sélection des transformants (utilisation d'une souche parentale auxotrophe pour l'uracil; *ura3⁻*), alors que les séquences *cat* (séquences partielles du gène codant pour la *chloramphenicol acetyl transferase*) permettent une recombinaison intra-chromosomique afin d'éliminer le gène *Ura3* (l'utilité de ceci est expliquée plus loin).

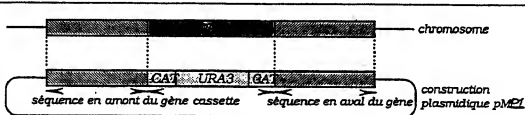


Figure 5.2. Construction de pMP1 pour la mutagenèse du gène *Pka-r*. Les séquences situées en amont et en aval du gène *Pka-r* ont été introduites de part et d'autre de la cassette *cat-Ura3-cat*.

La construction pMP1 fut utilisée pour transformer la souche CAI4 (*ura3⁻*) de *C. albicans*.³ La sélection des transformants fut faite sur milieu minimal afin de permettre uniquement la croissance de ceux ayant intégré la cassette *cat-Ura3-cat* à leur génome. Neuf des transformants obtenus ont été testés par analyse de type Southern, afin de vérifier le remplacement d'un premier allèle du gène *Pka-r* par la cassette (Figure 5.3).

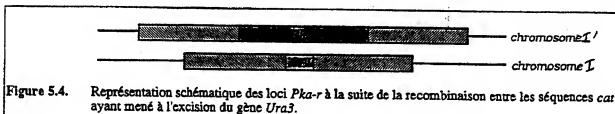
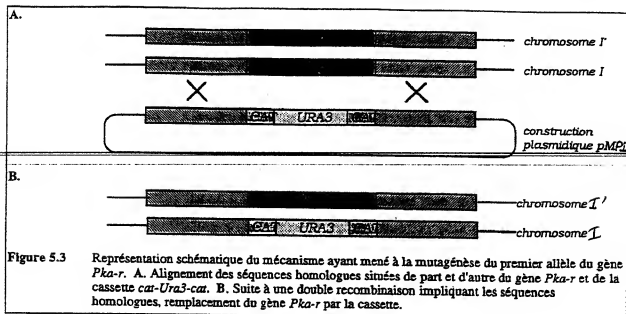
Deux des transformants vérifiés se sont avérés être les mutants hémizygotés recherchés, c'est-à-dire ne possédant plus qu'un seul allèle du gène *Pka-r* (génotype *Pka-r / Δpka-r::cat-Ura3-cat*). Ces mutants hémizygotés avaient un phénotype mycélien constitutif. Ces résultats confirmaient à nouveau l'implication de la PKA dans le contrôle du dimorphisme (tout comme l'avait fait la mutagenèse du gène *Pka-c*; section 5.4).

Afin de pouvoir déléter le deuxième allèle du gène *Pka-r*, il a d'abord fallu rétablir l'auxotrophie à l'uracile chez un des mutants hémizygotés. Pour ce faire, le mutant hémizygoté fut placé sur milieu complet permettant ainsi la perte du gène *Ura3* par une recombinaison entre les séquences *cat* situées de part et d'autre de celui-ci (menant à l'excision du gène *Ura3*). Les

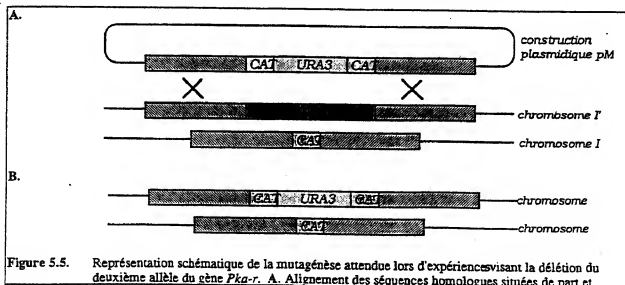
² Selon la littérature et notre expérience personnelle.

³ CAI4 est une souche standard utilisée dans plusieurs laboratoires à travers le monde.

révertants *ura3⁻* furent ensuite sélectionnés sur milieu contenant du 5-FOA, une substance toxique pour les cellules possédant encore un gène *Ura3* fonctionnel. Vingt-trois révertants *ura3⁻* furent vérifiés par analyse de type Southern afin de confirmer la perte du gène *Ura3* (Figure 5.4).

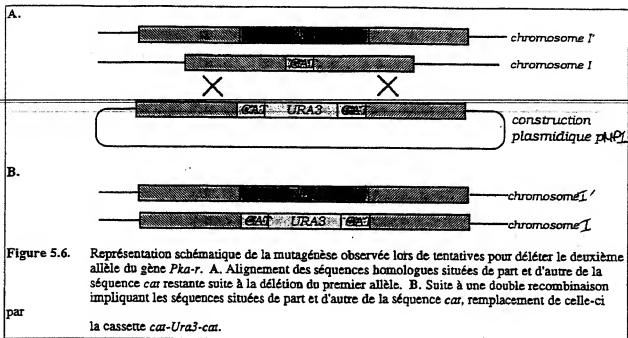


Un de ces révertants (*Pka-r* / *Apka-r::cat*) fut sélectionné pour la mutagenèse du deuxième allèle *Pka-r* en utilisant à nouveau la construction plasmidique pMP1 (Figure 5.5). Plusieurs séries de transformants furent analysées par Southern afin de détecter un mutant ayant subi la délétion du deuxième allèle *Pka-r*. Au total, 113 transformants furent ainsi analysés parmi lesquels aucun ne s'avéra être un mutant *pka-r* homozygote nul (*Apka-r::cat-Ura3-cat* / *Apka-r::cat*).

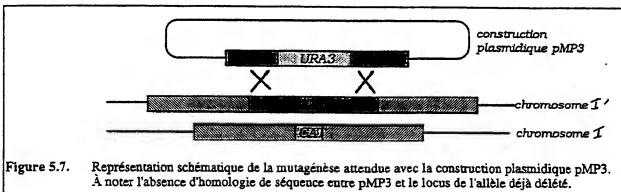


d'autre du gène *Pka-r*. B. Suite à une double recombinaison impliquant les séquences situées de part et d'autre du gène *Pka-r*, remplacement de celui-ci par la cassette *cat-Ura3-cat*.

En fait, on observait dans la presque totalité des cas que le locus *Pka-r* déjà délété était à nouveau la cible de la double recombinaison (Figure 5.6).



Ces résultats ne pouvaient s'expliquer par des problèmes techniques de mutagenèse. Étant donné le nombre élevé de transformants analysés, ces résultats suggéraient plutôt une impossibilité de déléter les deux allèles du gène *Pka-r*. Afin vérifier cette hypothèse, une nouvelle construction fut générée pour la mutagenèse. Dans cette construction, appelée pMP3, le gène *Ura3* fut placé au centre de la séquence codant pour le gène *Pka-r* (sans les séquences situées en amont et en aval du gène; Figure 5.7).



Comme les séquences présentes sur cette construction ne se retrouvent qu'au locus non encore délété, cette situation devait forcer l'intégration du gène *Ura3* dans l'allèle *Pka-r* restant. Cependant, aucun des 20 transformants vérifiés par analyse de type Southern n'eût le deuxième allèle *Pka-r* délété.

Ces résultats négatifs furent alors considérés en même temps que deux autres observations que nous avions faites lors de ces expériences de mutagenèse. Premièrement, le nombre de

transformants obtenus lors des expériences visant la délétion du deuxième allèle *Pka-r* (avec pMP1 et pMP3) était environ 30% inférieur à celui obtenu normalement lors d'expériences de mutagenèse semblables (visant d'autres gènes). Deuxièmement, une portion importante des transformants ne formait que de très petites colonies sur les pétris de transformation; diamètre de 0.5 mm comparativement au diamètre habituel de 2-3 mm.⁴ Lorsque ces petites colonies furent repiquées en milieu liquide ou rééplées sur milieu gélosé, aucune croissance ne fut observée. Prises ensemble, ces observations suggéraient qu'en perdant le deuxième allèle du gène *Pka-r*, les transformants ne pouvaient tout simplement pas croître (réduction du nombre de transformants obtenus), ou encore croître uniquement pour une période de temps limitée (présence de petites colonies non-viables).

Comme les difficultés à identifier des mutants *pka-r* homozygotes nuls ne semblaient pas être de nature technique, nous avons alors posé comme hypothèse que la présence dans la cellule de PKA-C toujours active (le rôle de PKA-R étant de s'associer à l'enzyme PKA-C afin de la maintenir dans un état inactif) s'avérerait létale pour *C. albicans*. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons entrepris de générer un mutant *pka-r* homozygote nul chez une souche ne possédant pas d'enzyme PKA-C (mutant *pka-c* homozygote nul). En théorie, chez un tel mutant, l'absence de PKA-R ne devrait pas nuire à la cellule puisque celle-ci ne renferme pas d'enzyme PKA-C.

Lors de la mutagenèse du premier allèle de *Pka-r*, cinq des seize transformants vérifiés par analyse de type Southern se sont avérés être du génotype attendu (*Pka-r* / *Δpka-r::cat-Ura3-cat Δpka-c::cat* / *Δpka-c::cat*).⁵ Tout comme décrit précédemment, un de ces mutants fut utilisé pour obtenir des révertants *ura3*⁻. Un des révertants obtenus (*Pka-r* / *Δpka-r::cat Δpka-c::cat* / *Δpka-c::cat*) fut utilisé pour la mutagenèse du second allèle *Pka-r*, après vérification du génotype par analyse de type Southern. Neuf des 31 transformants obtenus lors de ces expériences furent confirmés être des mutants *pka-r* homozygotes nuls (*Δpka-r::cat-Ura3-cat* / *Δpka-r::cat Δpka-c::cat* / *Δpka-c::cat*) par analyse de type Southern. Ces résultats confirmaient que l'impossibilité d'obtenir des mutants *pka-r* homozygotes nuls à partir de la souche CA14 n'était pas due à un problème technique mais plutôt à la létalité de la condition (Tableau 5.1).

Génotype visé	Nbre de transformants témoins par analyse de type Southern	Nbre de mutants obtenus ayant le génotype désiré (%)
<i>Pka-c</i> / <i>Δpka-c::cat-Ura3-cat</i>	10	10 (100)
<i>Δpka-c::cat-Ura3-cat</i> / <i>Δpka-c::cat</i>	36	7 (20)
<i>Pka-r</i> / <i>Δpka-r::cat-Ura3-cat</i> (avec pMP1)	9	2 (23)
<i>Δpka-r::cat-Ura3-cat</i> / <i>Δpka-r::cat</i> (avec pMP1)	113	0 (0)
<i>pka-r::ura3</i> / <i>Δpka-r::cat</i> (avec pMP3)	20	0 (0)

⁴ Ces petites colonies furent observées lors d'expérience de mutagenèse tant avec pMP1 qu'avec pMP3.

⁵ Ces expériences de mutagenèse ont été réalisées avec la construction pMP1 en utilisant une souche *pka-c* homozygote nul (*Δpka-c::cat* / *Δpka-c::cat*) issue de nos expériences de mutagenèse sur le gène *Pka-c*.

<i>Pka-r / Δpka-r::cat-Ura3-cat</i> <i>Δpka-c::cat / Δpka-c::cat</i> <i>(pMPL)</i>	(avec	16	5	(32)
<i>Δpka-r::cat-Ura3-cat / Δpka-r::cat</i> <i>Δpka-c::cat / Δpka-c::cat</i> <i>(pMPL)</i>	(avec	31	9	(29)

Tableau 5.1. Sommaire des résultats d'expériences de mutagenèse visant l'obtention de mutants *pka-c* et *pka-r* homozygotes nuls chez *C. albicans*.

Des observations faites en microscopie optique ont révélé que les doubles mutants avaient une morphologie cellulaire atypique (forme cellulaire très irrégulière). De plus, contrairement à la coloration blanche habituelle, les colonies de ces doubles mutants adoptaient une coloration jaune très distinctive.

RÉFÉRENCES

- Groll A.H., De Lucca A.J. & T.J. Walsh (1998). Emerging targets for the development of novel antifungal therapeutics. *Trends in Microbiol.* 6: 117-124.
- Groll A.H., Shah P.M., Mentzel C., Schneider M., Just-Nuebling G. & K. Huebner (1996). Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *J. Infect.* 33: 23-32.
- Minamoto G.Y. & A.S. Rosenberg (1997). Fungal infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Med. Clin. North Am.* 81: 381-409.
- Pfaller M.A. (1992). Epidemiological typing methods for mycoses. *Clin. Infect. Dis.* 14(S1): S4-S10.
- Sternberg S. (1994). The emerging fungal threat. *Science* 266: 1632-1634.
-

Walsh T.J., Hiemenz J.W. & E. Anaissie (1996). Recent progress and current problems in treatment of invasive fungal infections in neutropenic patients. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 10: 365-400.

6. Utilité principale de l'invention et ses avantages

6.1 Positionnement de la découverte

Traditionnellement, la découverte de nouveaux médicaments a été basée sur le criblage systématique de produits naturels et synthétiques dans des tests biologiques et pharmacologiques. ~~Cependant, cette approche n'a pas permis de générer le nombre de composés~~ antifongiques requis: l'arsenal étant encore extrêmement limité, particulièrement en ce qui regarde le traitement des infections fongiques systémiques (Tableau 6.1).

CLASSE ET COMPOSÉ	MOLECULE CIBLÉE / MODE D'ACTION
Polyène • Amphotéricine B	Interaction avec l'ergostérol de la membrane, formation de canaux, perméabilité aux cations entraînant la mort cellulaire
Analogues de nucléosides • 5-Fluorocytosine	Déamination intracellulaire en 5-fluorouracil, interférence avec la synthèse et les rôles biologiques de l'ADN et de l'ARN
Dérivés azoles • Kétoconazole • Fluconazole • Itraconazole	Interaction avec le cytochrome P-450, inhibition de la déméthylation du lanostérol entraînant un épuisement de l'ergostérol et l'accumulation de stérols toxiques dans la membrane cellulaire
Allylamines • Terbinafine	Inhibition de la squalène époxidase, épuisement de l'ergostérol et accumulation de stérols toxiques dans la membrane cellulaire
Inhibiteur de mitose • Griséofulvine	Inhibition de la mitose en métaphase par interaction avec les microtubules

Tableau 6.1. Agents antifongiques systémiques en usage clinique.

L'Amphotéricine B et le fluconazole sont de loin les antifongiques les plus couramment utilisés et ce, en dépit du fait que l'Amphotéricine B entraîne des effets secondaires importants (fièvre, nausée, et cytotoxicité rénale), et que le fluconazole, mis sur le marché il y a une douzaine d'années seulement, soit déjà confronté à des problèmes importants de résistance (Edwards, 1991; White, 1997).

Afin de combler ce manque flagrant de médicaments antifongiques efficaces et sans effet secondaire, une nouvelle approche basée sur l'identification et la dissection de réactions enzymatiques essentielles au fonctionnement de la cellule s'est développée au cours des dernières années. Plusieurs laboratoires se sont lancés dans cette quête de cibles cellulaires essentielles à la survie des pathogènes fongiques (Kurtz 1998; Mitchell 1998). Malgré ces efforts, encore peu de cibles ont été identifiées. Parmi celles-ci, seulement quelques unes sont actuellement utilisées pour le développement de composés antifongiques (Groll *et al.*, 1998; Tableau 6.2).

CLASSE ET COMPOSÉ	MOLÉCULE CIBLÉE / MODE D'ACTION
Triazoles • UK 109496	Interaction avec le cytochrome P-450, inhibition de la déméthylation du lanostérol entraînant un épuisement de l'ergostérol et l'accumulation de stérols toxiques dans la membrane cellulaire
Echinocandines • LY 303366 • L 743872 (MK-0991)	Inhibition de la β -(1,3)glucane synthétase entraînant un épuisement en glucanes et donc une fragilité osmotique
Pradimicines • BMS 181184 • Benanomycin A	Formation de complexes avec les mannoprotéines de la paroi cellulaire, entraînant des perturbations au niveau de la membrane et la mort cellulaire
Polyènes • Nystatin liposomique	Interaction avec l'ergostérol de la membrane, formation de canaux, perméabilité aux cations entraînant la mort cellulaire
Nikkomycines • Nikkomycin Z	Inhibition de la synthèse de la chitine entraînant un arrêt de croissance et une fragilité osmotique
Sordarines • GM 237354	Interaction avec le facteur d'élongation 2 impliqué dans la synthèse des protéines

Tableau 6.2. Agents antifongiques systémiques en développement.

La difficulté dans l'identification de cibles tient au fait que les cellules fongiques, tout comme les cellules humaines, sont eucaryotes, limitant ainsi considérablement le nombre de cibles cellulaires sur lesquelles il est possible d'agir sans interférer avec le fonctionnement normal des cellules humaines.

6.2 Avantages de PKA-R comme cible

Un premier avantage d'utiliser la PKA-R comme cible est que sa fonction cellulaire, de même que son mode d'action sont déjà connus (par analogie avec ce qui a été observé chez d'autres organismes). Ce mode d'action rend d'ailleurs la PKA-R particulièrement attrayante pour le développement de composés antifongiques. En effet, comme la PKA-R exerce son action en interagissant physiquement avec la PKA-C, une stratégie simple peut être envisagée pour bloquer l'interaction entre ces deux protéines. Ainsi, en empêchant l'interaction PKA-C / PKA-R, on créerait une condition simulant l'absence de PKA-R ce qui s'avérerait létal pour les cellules de *C. albicans*. Ainsi, pour empêcher l'association de PKA-R à PKA-C, on pourrait développer des molécules qui, en se liant à la PKA-R, préviendraient son interaction avec PKA-C (Figure 6.1).⁶

⁶ Deux autres stratégies sont également possibles: (1) empêcher la PKA-C de s'associer à la PKA-R par l'intermédiaire de molécules qui, en se liant à celle-ci (sans interférer avec l'activité kinase de la PKA-C), bloqueraient l'interaction avec la PKA-R; et (2) bloquer ou diminuer la production de PKA-R sous un seuil létal par l'intermédiaire de molécules qui interféreraient avec les protéines impliquées dans le contrôle de l'expression du gène *Pka-r*. Cette dernière approche requerrait cependant des recherches supplémentaires sur la régulation de l'expression du gène *Pka-r*.

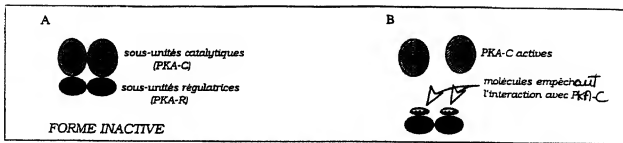


Figure 6.1. Stratégie pour empêcher l'inactivation de la PKA-C. A. La PKA est inactive sous sa forme tétramérique. B. Molécules qui, en se liant à la PKA-R, empêchent son interaction avec PKA-C.

La recherche de telles molécules pourrait se faire en utilisant la chimie combinatoire (voir travail proposé à la section 8.0). Les molécules ayant une affinité pour PKA-R pourraient facilement être évaluées pour leur capacité à interférer avec l'interaction PKA-C / PKA-R par un test simple et rapide mesurant *in vitro* l'activité de la PKA-C. Ce test rend encore plus attrayant l'utilisation de la PKA-R comme cible cellulaire. En effet, celui-ci permettra de déterminer rapidement si les molécules ayant une affinité pour PKA-R ont un potentiel comme agent thérapeutique.

Nous avons aussi déterminé et comparé la séquence de la protéine PKA-R de *C. albicans* avec celle de chacune des quatre sous-unités régulatrices existant chez l'humain soit PKA-R I α , PKA-R I β , PKA-R II α et PKA-R II β . Cette analyse a démontré qu'il existe peu d'homologie entre les PKA-R de ces deux organismes; l'homologie maximale étant de seulement 34.0 % avec la protéine PKA-R I β . De plus, la délétion d'un gène PKA-R chez la souris - la seule à avoir été tentée chez les cellules de mammifères - ne s'est pas avérée létale. Ces données renforcent l'idée que le gène *Pka-r* puisse constituer une cible intéressante pour le développement de substances antifongiques.⁷ En effet, comme la PKA-R de *C. albicans* est différente de celles présentes chez l'humain, les chances sont faibles pour qu'une molécule mise au point pour contrer l'activité de la PKA-R de *C. albicans* ait le même effet sur les PKA-R humaines. De même, comme chez la souris l'absence complète d'une sous-unité PKA-R ne semble pas affecter la survie des cellules, il est possible que par analogie, les cellules humaines tolèrent l'inactivation de PKA-R humaines.

6.3 Intérêt pour cette découverte

Plusieurs compagnies pharmaceutiques et biotechnologiques consentent actuellement des sommes importantes à la recherche de cibles cellulaires pour le développement de composés antifongiques.

RÉFÉRENCES

- Garrad R.C. and J.K. Bhattacharjee (1992). Lysine biosynthesis in selected pathogenic fungi: characterization of lysine auxotrophs and the cloned LYS1 gene of *Candida albicans*. J. Bacteriol. 174: 7379-7384.
- Gozalbo D., Elorza M.V., Sanjuan R., Marcilla A., Valentin E. and R. Sentandreu (1993). Critical steps in fungal cell wall synthesis: strategies for their inhibition. Pharmacol. Ther. 60: 337-345.
- Groll A.H., De Lucca A.J. & T.J. Walsh (1998). Emerging targets for the development of novel antifungal therapeutics. Trends in Microbiol. 6: 117-124.
- Kurtz M.B. (1998). New antifungal drug targets: a vision for the future. ASM News 64: 31-39.
- Mason A.B., Kardos T.B., Perlin D.S. and B.C. Monk (1996). Functional complementation between transmembrane loops of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* plasma membrane H(+)-ATPases. Biochim. Biophys. Acta. 1284: 181-190.
- Mio T., Yabe T., Sudoh M., Satoh Y., Nakajima T., Arisawa M. and H. Yamada-Okabe (1996). Role of three chitin synthase genes in the growth of *Candida albicans*. J. Bacteriol. 178: 2416-2419.
- Mitchell T.G. (1998). Medical mycological research and training: needs and opportunities. ASM News 64: 17-23.
- Monk B.C., Mason A.B., Abramochkin G., Haber J.E., Seto-Young D. and D.S. Perlin (1995). The yeast plasma membrane proton pumping ATPase is a viable antifungal target. I. Effects of the cysteine-modifying reagent omeprazole. Biochim. Biophys. Acta 1239: 81-90.
- White T.C. (1997). Antifungal drug resistance in *Candida albicans*. ASM News 63: 427-433.
- Tanner W., Gentzsch M., Immervoll T., Scheinost A. and S. Strahl-Bolsinger (1995). Fungal glycoproteins and their biosynthetic pathway as potential targets for antifungal agents. Acta. Biochim. Pol. 42: 505-508.

7. Art antérieur pertinent

Une recherche sommaire réalisée sur le «*IBM patent server*» (<http://patent.womplex.ibm.com/>) en utilisant «*Candida*» et «*kinase*» comme mots-clé, n'a pas permis de trouver de brevets portant sur le même sujet.

8. Description détaillée du travail à réaliser

Afin d'augmenter l'attrait de la découverte pour l'industrie, nous proposons d'initier la recherche menant à l'identification de molécules ayant une affinité pour PKA-R et pouvant inhiber l'interaction PKA-C / PKA-R. Pour ce faire, la chimie combinatoire est l'approche privilégiée.

Comme première étape, nous proposons l'utilisation du «*phage display*», une approche permettant l'identification de séquences peptidiques interagissant avec une protéine cible (Cortese *et al.*, 1995). Dans le cas présent, nous chercherions des séquences peptidiques ayant une affinité pour PKA-R. L'approche du «*phage display*» requiert que l'on possède de grandes quantités de la protéine cible, en l'occurrence PKA-R. Nous proposons donc d'effectuer le clonage du gène *Pka-r* dans un vecteur d'expression afin de le surexprimer dans *E. coli*. La protéine surproduite sera ensuite utilisée comme appât dans les expériences de «*phage display*» en utilisant des banques peptidiques disponibles commercialement. Par la suite, à partir des séquences consensus identifiées chez les clones sélectionnés, des peptides seraient synthétisés et

testés *in vitro* afin de déterminer s'ils peuvent s'associer à PKA-R et prévenir l'interaction PKA-C / PKA-R.⁹

Afin de vérifier l'effet des peptides identifiés par «*phage display*» sur l'interaction PKA-C / PKA-R, une source de PKA-C est également nécessaire. C'est pourquoi nous proposons le clonage du gène *Pka-c* dans un vecteur d'expression afin de surproduire PKA-C.

Les sous-sections suivantes (8.1 à 8.3) présentent une description détaillée du travail proposé.

8.1 Mutagenèse des gènes *Pka-r* et *Pka-c*

C. albicans n'utilise pas le code génétique universel pour le codon CUG, traduisant celui-ci en sérine plutôt qu'en leucine comme c'est le cas chez les autres organismes (Santos & Tuite, 1995). Cette particularité doit être prise en considération lors d'expériences visant l'expression de gènes de *C. albicans* dans *E. coli*.

Dans le cas du gène *Pka-c*, quatre codons CUG sont présents dans la séquence. Ceux-ci sont situés aux positions 13, 16, 390 et 413 par rapport au codon d'initiation Met (longueur totale de PKA-C: 442 acides aminés). Comme il est possible que la substitution de ces sérines par des leucines (lors de la traduction dans *E. coli*) induise des changements conformationnels de nature à affecter soit l'activité de la PKA-C soit son interaction avec PKA-R, il apparaît essentiel de convertir - par mutagenèse - les codons CUG en codons ACG (sérine). La protéine surproduite dans *E. coli* serait ainsi identique en séquence à celle produite dans *C. albicans*. Le même type de changement serait nécessaire dans le cas du gène *Pka-r* qui contient un codon CUG à la position 96 relativement au codon d'initiation Met (longueur totale de PKA-R: 459 acides aminés).

Pour leur mutagenèse, les cadres de lecture des gènes *Pka-c* et *Pka-r* seraient d'abord amplifiés par PCR puis clonés dans le phagémide pTZ18 (Pharmacia). Afin de faciliter le clonage ultérieur des gènes *Pka-c* et *Pka-r* dans un vecteur d'expression (section 8.2), un site de restriction *NdeI* - comprenant le codon d'initiation ATG (CATATG) - sera incorporé dans les amorces complémentaires du début du cadre de lecture de chacun des gènes. De la même manière, un site de restriction *BamHI* - comprenant le codon de terminaison TAG (TAGGATCC) - sera introduit dans les amorces complémentaires de la fin du cadre de lecture de chacun des gènes. Les clones retenus pour *Pka-c* et *Pka-r* seront séquencés afin de vérifier l'intégrité de la séquence (i.e. qu'aucun changement n'ait été introduit au cours de l'amplification PCR).

La mutagenèse sera effectuée à l'aide du «*Site-directed mutagenesis system*» (BioRad) en utilisant trois oligonucléotides pour la mutagenèse de *Pka-c* (à cause de leur proximité, les codons 13 et 16 nécessiteront un seul oligonucléotide), et un pour celle de *Pka-r*. Afin d'identifier les mutants désirés, cinq clones seront séquencés dans la région d'intérêt après chacune des étapes de mutagenèse. Le mutant retenu à chaque étape sera séquencé complètement afin de vérifier l'intégrité du reste du gène.

8.2 Cloner le gène *Pka-r* dans un vecteur d'expression

Le «*pET expression system*» (Novagen) sera utilisé pour la surproduction des protéines PKA-C et PKA-R dans *E. coli*. Les séquences mutagenisées de *Pka-r* et *Pka-c* seront excisées du

⁹ Le criblage de banques de molécules chimiques de nature non-peptidique permettrait probablement aussi d'identifier des composés ayant une affinité pour PKA-R et prévenant l'interaction PKA-C / PKA-R. Cependant, à ce stade-ci (i.e. sans protection par un brevet), toute démarche dans ce sens auprès de compagnies possédant de telles banques nous apparaît prématurée.

vecteur pTZ18 à l'aide des enzymes de restriction *NdeI* et *BamHI* (sites de restriction incorporés aux amorces PCR), puis clonées dans le vecteur pET28a en utilisant les mêmes sites. La production de PKA-C et PKA-R dans *E. coli* sera vérifiée sur gel d'acrylamide selon le protocole de Novagen.

Le clonage de *Pka-r* et *Pka-c* dans le site *NdeI* du vecteur pET28a permet la production d'une protéine recombinante possédant un «His-Tag» (une séquence de six histidines suivie d'un site de clivage par la thrombine - une endopeptidase) à son extrémité N-terminale. Ce «His-Tag» permet la purification de la protéine à l'aide d'une colonne d'affinité de nickel «His-Bind» (Novagen). Afin d'éviter que le «His-Tag» n'interfère avec les fonctions et les interactions des protéines

PKA-C et PKA-R, celui-ci sera enlevé à l'aide de thrombine biotinylée (utilisée dans un ratio 1:2000 thrombine:protéine recombinante). La thrombine biotinylée sera par la suite enlevée par passage sur streptavidine-agarose (Novagen).

La concentration protéique des PKA-C et PKA-R purifiées sera déterminée à l'aide du «Protein assay kit» de Sigma (basé sur la méthode micro-Lowry modifiée par Peterson). L'activité enzymatique de la PKA-C sera testée *in vitro* par la méthode de phosphorylation de Roskosky (1983) en utilisant du [γ - 32 P]ATP et le substrat spécifique «Kempide» (un heptapeptide). L'activité de la PKA-R sera mesurée par son habileté à inactiver la PKA-C dans les tests de phosphorylation *in vitro*.

Il a été observé que les protéines surproduites dans *E. coli* peuvent parfois être obtenues sous la forme d'aggrégats insolubles (appelés «corps d'inclusion»). Ce problème est le plus souvent résolu en modifiant les conditions de croissances (durée, température et concentration de l'inducteur) ou en dénaturant et renaturant lentement les protéines. Cependant, en dépit de la présence de «corps d'inclusion», une portion significative de protéines solubles peut généralement être obtenue. Avec la grande efficacité de la méthode de purification par le «His-Tag», cette portion soluble est généralement suffisante pour permettre la purification de grandes quantités de protéines actives.

8.3 Expériences de «phage display»

Le «phage display» est une technique de sélection utilisant des peptides exprimés à la surface de phages recombinants. Par cette approche, on permet l'établissement d'un lien physique entre les peptides d'une banque de séquences aléatoires et une protéine cible.

Deux banques peptidiques construites dans la protéine pIII du phage M13 seraient utilisées pour cette approche. La première serait la «Disulfide Constrained Peptide Library» (New England Biolabs) contenant 3.7×10^6 clones indépendants. Cette banque d'heptapeptides est suffisamment complexe pour contenir la plupart sinon toutes les séquences possibles ($20^7 = 1.28$

$\times 10^9$). Les heptapeptides sont flanqués d'une paire de résidus cystéine qui, dans des conditions non-dénaturantes, forment spontanément des ponts disulfides, produisant alors des peptides cycliques. De telles banques peptidiques ont été utilisées avec succès pour l'identification de molécules possédant des propriétés thérapeutiques (Wrighton *et al.*, 1996; Cwiria *et al.*, 1997).

La deuxième banque utilisée serait la «*Peptide 12-mer library*» (New England Biolabs) contenant 1.9×10^9 clones indépendants. Cette banque ne contient donc pas tous les peptides possibles ($20^{12} = 4.1 \times 10^{13}$). Elle est plutôt considérée comme une banque d'heptapeptides distribués sur une «fenêtre» de 12 résidus de largeur. Cette banque peut permettre

l'identification de peptides lorsque: (1) la protéine cible requiert plus de 7 acides aminés pour une interaction stable; (2) l'interaction des 7 acides aminés doit se faire sur une plus grande distance; (3) une structure tertiaire est nécessaire pour l'interaction avec la protéine cible.

Les banques seront criblées suivant les recommandations du manufacturier en utilisant la sous-unité PKA-R comme protéine cible. Pour chacune des banques, une quarantaine de clones démontrant une affinité pour PKA-R seront séquencés. Les séquences obtenues seront analysées afin de détecter la présence de séquences consensus. Si tel est le cas, celle-ci sera ensuite utilisée pour permettre la synthèse d'un peptide (initialement, un par banque) qui sera testé pour sa capacité à se lier à PKA-R et à empêcher l'interaction PKA-C / PKA-R *in vitro* lors de tests de phosphorylation (Roskosky, 1983).

Il est possible que la protéine cible reconnaisse une structure plutôt qu'une séquence. Dans ce cas, une séquence consensus ne pourra être observée. Il faudra alors synthétiser quelques-uns des peptides, avec des cystéines aux extrémités N- et C- terminales, et les tester pour leur capacité à inhiber l'interaction PKA-C / PKA-R dans des essais de phosphorylation *in vitro* (Koivunen *et al.*, 1994; Luzzago *et al.*, 1993; Pasqualini *et al.*, 1995).

Mon laboratoire possède l'expertise nécessaire pour mener à bien les expériences proposées. L'amplification et le clonage de produits PCR sont réalisés de façon routinière dans mon laboratoire. Je suis également familier avec le «*Site-directed mutagenesis system*» de BioRad, l'ayant utilisé au cours de mes études doctorales pour introduire des mutations dans un gène d'origine fongique. De plus, lors de mon stage postdoctoral, j'ai eu l'occasion d'utiliser le système d'expression pET de Novagen pour surexprimer un gène d'origine fongique. Le test de Roskosky (1983) pour mesurer l'activité de la PKA-C est utilisé de façon routinière dans le laboratoire. En ce qui concerne les expériences de «*phage display*», nous pourrions compter sur la collaboration du Dr Guy Bellemare (Dépt biochimie, Université Laval) qui possède l'expertise dans ce domaine.

L'équipement requis pour réaliser ces travaux (hotte à flux laminaire pour travail avec *C. albicans*, appareil PCR, équipement d'électrophorèse pour ADN et protéines, centrifugeuses, incubateurs...) est disponible dans mon laboratoire. Nous disposons également d'un laboratoire pour les travaux impliquant l'utilisation de radioisotopes.

RÉFÉRENCES

- Cortese R., Monaci P., Nicosia A., Luzzago A., Felici F., Galfre G., Pessi A., Tramontano A. & M. Sollazzo (1995). Identification of biologically active peptides using random libraries displayed on phage. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6: 73-80.
- Cwiria S.E., Balasubramanian P., Duffin D.J., Wagstrom C.R., Gates C.M., Singer S.C., Davis A.M., Tansik R.L., Matheakis L.C., Boytos C.M., Schatz P.J., Baccanari D.P., Wrighton N.C., Barrett R.W. & W. J. Dower (1997). Peptide agonist of the thrombopoietin receptor as potent as the natural cytokine. *Science* 276: 1696-1699.

- Goodvin A.R. & D.J. Adams (1996). Purification and characterization of cyclic AMP-dependent protein kinase from *Candida albicans*. *Mycol. Res.* 100: 625-631.
- Kawai M. & H. Uchimiya (1995). Biochemical properties of rice adenylate kinase and subcellular location in plant cells. *Plant Mol. Biol.* 27: 943-951.
- Koivunen E., Wang B. & E. Ruoslahti (1994). Isolation of a highly specific ligand for the α -5 β -1 integrin from a phage display library. *J. Cell Biol.* 124: 373-380.
- Li Y., Zhang Y. & H. Yan (1996). Kinetic and thermodynamic characterizations of yeast guanylate kinase. *J. Biol. Chem.* 271: 28038-28044.
- ~~Luzzago A., Felici F., Tramontano A., Pessi A. & R. Cortese (1993). Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides, I. Epitope mapping of human H ferritin using a phage library of constrained peptides. *Gene* 128: 51-57.~~
- Mizoguchi T., Yamaguchi-Shinozaki K., Hayashida H., Kamada H. & K. Shinozaki (1993). Cloning and characterization of two cDNAs encoding casein kinase II catalytic subunits in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 21: 279-289.
- Pasqualini R., Koivunen E. & E. Ruoslahti (1995). A peptide isolated from phage display libraries is a structural and functional mimic of an RGD-binding site on integrins. *J. Cell Biol.* 130: 1189-1196.
- Roskoski R. (1983). Assays of protein kinase. *Methods Enzymol.* 99: 3-6.
- Santos M.A. & M.F. Tuite (1995). The CUG codon is decoded *in vivo* as serine and not leucine in *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res.* 23: 1481-1486.
- Slice L.W. & S.S. Taylor (1989). Expression of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 264: 20940-20946.
- Wrighton N.C., Farrell F.X., Chang R., Kashyap A.K., Barbone F.P., Mulcahy L.S., Johnson D.L., Barrett R.W., Jolliffe L.K. & W.J. Dower (1996). Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin. *Science* 273: 458-464.

SEQUENCE DU LOCUS DU GENE PKA-R DE CANDIDA ALBICANS

gaattcagaataatcaaaaaaaccaaaaaaacccgtggaaggtgaagttgtatattcttaa
 atcaacgtgaataaattttcaacactgtgtcaacatctgtgaaaaaacctgtggtgactg
 catataggacctccacctatttcgtagaatatatctogaaatagttacaaccataaaaaagat
 taattgtgcttacgtggccaactttgagattttctctttctgtttctctctctctctct
 ttggcttaaacacaacaaatgtgcgaattatacaaacgcaactttgtgcccattgtcatatt
 gtgcttatcaagtggaagtgtcgagatttatgtattctcactttcattctctatggtcatca
 attgtctctctctctctctctctcaaaaattctgtgattttgatgtttttgattcaaaagaa
 gcaaaaggaataactgaaaaaaagcgaagagaatalegaaaaagaaacaataaaaagaatagt
 ttctaaagttctctttggagttctgtctattaccatgtatctatgtgattgcccatacaaatg
 gacaaacgggtttttgttttagtcacgataatcacaaactctccccagcaatgcacatacg
 tagcaagtaataattatctctctctctctcttttgatctacataaatctgtcgtgttttt
 ttaagttgtgttatgagaagtaaatctcaaatgattcaagttgtgtaactgaaattctcat
 cgcacattcaacaacaacagcaataatttctattattaaatgatttaattgtcgaagttga
 gtaaaattttgtctctctcttgagaaaaaggagaaattactttgggagtgagtttgagagag
 aaactcaagtaagtaaatgagtgagaggggagagacagagagcgagagggggagtaaaaa
 aaaaagtcgccacaacaaattgtgatccggctcttttagcatatattcttactcttca

atcaacatctttaccagttctaatctccaaacaacattctatctgataagattgtcgca
 M S N P Q Q Q F I S D E L T S Q

gttacagaaagaanaattttccaaaaaacccgcaagatgtcttacagttttgcgccaaacta
 L Q K E I I S X N P Q D V L Q F C A N Y

ttcaacaccagttacaagctcaagaagtugttatggtcgcaacaagctaaagcaga
 F N T K L Q A Q R S E L W S Q Q A K A E

agccgcaggcatcgacttatcccatctgttgatcatgtgaattgtaattcttagtggtgt
 A A G I D L F P S V D H V N V N S S G V

gagcattgtgaatgatagacaaccagtttttaaatcaccttttgggtgtaaatgatccaca
 S I V N D R Q P S F K S F F G V N D P H

tctgaatcagcagaagatccccatgccaaagatccccaaacagataactgctgtgctgc
 L N H D E D P H A K D T K A T A A G C

tttgggggggtttttcaaatcaaattttgatgttaaaaagagtgcttctaattctctc
 V G G G G I F K S N F D V K K S A S N P P

aaccaaggaagttagctccagatgacctatcaaaacccatcgctcatcgagccaacaaacta
 T K E V D P D D P S K P S S S S Q P N Q C

acaatcagcatcagcatcatcaaaaacgccatcatcaagatccccagttgctttcaagc
 Q S A S A S S K T P S S K I P V A F N A

taataagaaacatttgaattttgtgaagccttgatccagcaaaattgaatttagatag
 N R R T S V S A E A I N P A K L K L D S

ttggaaaccttcugttaataatttgagcattaccgaagaagaacattagccaacaattt
 W K P P V N N L S I T E E E T L A N N L

aaagatacaatttctctttcaaaactttggacgcaaaactctaagaaaactgtgattgctgc
 K N N F L F K Q L D A N S K K T V I A A

tttacacaaaaaatcatttgcataagatacagtaaatatccaacagggtgatgaagggga
 L Q O K S F A K D T V I I Q Q G D E G D

cttttttccatttattgaacccgggtacagttgattttcattgtaaatgatgctaaagtaag
F F Y I I E T G T V D F Y V N D A K V S

ttccagtagcgaaagggatcatcttttgggggaattggcittgatgtataattcaccaagagc
S S S E G S S F G E L A L M Y N S P R A

tgctacgggcatttgcgcacggatgtctgtctgttgggcattggaccgtttgacattccg
A T A V A A T D V V C W A L D R L T F R

tccgaattcttttgaaggttacttttaacaagagattgatgtacgaggatttctttaaaga
R I L L E G T F N K R L M Y E D F L K D

tattgaggttttgaactctcttttcggatcatgcacgttcaaaattggcagatgcattgag
I E V L K S L S D H A R S K L A D A L S

cacagaaatgtatccacagggtgatuaactagtccactgaaggtgaacaaggagagaaactt
T K M Y H K G D K I V T E G E Q G E N F

ttatctaatagaaagtggaaactgtccagtttacaatgaaagttgggcaatatcaaa
Y L I E S G N C Q V Y N E K L G N I K Q

attcaacaagaagtgattattttgggtgagcttgcatataaanaagacttaccagaagaagc
L T K G D Y F G E L A L I K D L P R Q A

tacttg-ggaagcattggataaagttaactcttgcacattaggtaaatccgggttccaaag
T V E A L D N V I V A T L G K S G F Q R

attatgggtctcttcttggagggtatttgaaagaacaagaccctacaagagctcaagacc
L L G P V V E V L K K Q D P T K S Q D P

aaactgtgtgtcat-aaagtgtacaaataagtagctgtttattatcttatattgttttatgtt
T A G H *

agctatattctatcttttttttttttgggttaclccactctctgggtctttctgttgcgatttt
gataa-ggatgg-gggtgcnaaagttccactacattctttgttgcaggatataacgaga
tggcagcatgaacgagctcmccatgggttguaacattattgaagttatccggccgtgtctt
tgggaacatlggttaactaattatattgcnaacttgggtcttacagaaaaatatacaatcta
atacc-tgagggaatttccctctatataatagugaa-ttc